

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-184382
 (43)Date of publication of application : 27.07.1993

(51)Int.CI. C12P 21/06
 // C12N 9/99

(21)Application number : 04-021651
 (22)Date of filing : 13.01.1992

(71)Applicant : KYODO NYUGYO KK
 (72)Inventor : OISHI HIFUMI

KIRIHARA OSAMU
 UCHIDA TOMOKO
 NONOMURA KAZUHIKO

(54) PRODUCTION OF INHIBITOR OF PROTEOLYTIC ENZYME ACTIVITY

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject inhibitor having a specific potency by reacting a casein solution with a cysteine protease inhibitor solution under specific conditions.

CONSTITUTION: 100 μ l papain solution (480m units/ml papain activated buffer solution) is mixed with 200 μ l cysteine protease inhibitor solution dissolved in 0.1M Tris-HCl buffer solution containing 0.15M NaCl and the mixture is pre-incubated at 37° C for 20min. Further, 300 μ l of 0.5% casein solution (dissolved in 0.1M Tris-HCl buffer solution at pH7.4) is further added as a substrate thereto and the ingredient is treated with an enzyme at 37° C for 60min. 100 μ l of 50% TCA is added thereto to terminate the reaction and an enzymatic reaction product in the deproteined reaction liquid is measured to provide the objective inhibitor of activity of proteolytic enzyme having potency in which 1 unit inhibitor activity inhibits 50% of 1 unit papain activity.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(51)Int.Cl.⁶

C12P 21/06

// C12N 9/99

識別記号

8214-4B

F I

審査請求 未請求 請求項の数1 (全4頁)

(21)出願番号

特願平4-21651

(22)出願日

平成4年(1992)1月13日

(71)出願人 000162412

協同乳業株式会社

東京都中央区日本橋小網町17番2号

(72)発明者 大石 一二三

東京都練馬区関町日東1-27-6-303

(72)発明者 桐原 修

東京都立川市柴崎町4-11-6-101

(72)発明者 内田 智子

東京都葛飾区西亀有3-25-17

(72)発明者 野々村 一彦

埼玉県狭山市入間川1545-27

(74)代理人 弁理士 石山 博 (外1名)

(54)【発明の名称】蛋白分解酵素活性疎外物質の製法

(57)【要約】

【目的】 蛋白分解酵素活性疎外物質の製法に関する。

【構成】 100 μ lのババイン溶液(4.80 m u n i t s / m l ババイン活性化緩衝液)と0.15 M NaClを含む0.1Mトリス-HCl緩衝液に溶解したシステイン・プロテアーゼ・インヒビター溶液200 μ lを混合し、37°C、20分間ブレインキユベートし、その後、0.5%カゼイン溶液(0.1Mトリス-HCl緩衝液、pH 7.4に溶解)300 μ lを基質として加え、37°C、60分間反応させ、50%TCAを100 μ l加えて反応を停止させると共に、除蛋白し、この除蛋白した反応液中の酵素反応産物を測定し、インヒビター活性1単位は1単位のババイン活性を50%阻害する力をとする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 $100\mu\text{l}$ のババイン溶液 (480 m units/m¹ ババイン活性化緩衝液) と 0.15 M NaCl を含む 0.1M トリス-HCl 緩衝液に溶解したシステイン・プロテアーゼ・インヒビター溶液 $200\mu\text{l}$ を混合し、37°C、20分間ブレインキユベートし、その後、0.5% カゼイン溶液 (0.1M トリス-HCl 緩衝液、pH 7.4 に溶解) $300\mu\text{l}$ を基質として加え、37°C、60分間反応させ、50% TCA を $100\mu\text{l}$ 加えて反応を停止させると共に、除蛋白し、この除蛋白した反応液中の酵素反応産物を測定し、インヒビター活性 1 単位は 1 単位のババイン活性を 50% 阻害する力値とした蛋白分解酵素活性疎外物質の製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は蛋白分解酵素活性疎外物質の製法に関する。

【0002】

【従来の技術】 乳汁中には他の体液 (血液等) と同様にシステイン・プロテアーゼ・インヒビター (シスタチン・ファミリー CF) が存在する。CF が牛乳のどの画分に存在するかについて、経験的にホエー画分に存在するとされ、ホエー蛋白濃縮物 (WPC) が CF として用いられてきた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかし発明者らが WPC から CF をアクイニティー・クロマトグラフィー法で調製しようと試みた場合、WPC 中の CF 活性は非常に低く、CF をホエー蛋白とするには非常に困難であると考えられた。そこで、牛乳をバターミルク、ホエー、及びカゼインの各画分に分画し、CF 活性の存在画分をスクリーニングし、ホエー画分よりもバターミルク画分に CF が局在していることを見いたした。バターミルク画分に存在する CF (B-CF) と既に報告されている CF との相同性を検討するために B-CF を精製し、その物性、種々のシステイン・プロテアーゼ及びセリン・プロテアーゼに対する影響を検討した。

【0004】

【課題を解決するための手段】 ここにおいてこの発明は、 $100\mu\text{l}$ のババイン溶液 (480 m units/m¹ ババイン活性化緩衝液) と 0.15 M NaCl を含む 0.1M トリス-HCl 緩衝液に溶解したシステイン・プロテアーゼ・インヒビター溶液 $200\mu\text{l}$ を混合し、37°C、20分間ブレインキユベートし、その後、0.5% カゼイン溶液 (0.1M トリス-HCl 緩衝液、pH 7.4 に溶解) $300\mu\text{l}$ を基質として加え、37°C、60分間反応させ、50% TCA を $100\mu\text{l}$ 加えて反応を停止させると共に、除蛋白し、この除蛋白した反応液中の酵素反応産物を測定し、インヒビ

ター活性 1 単位は 1 単位のババイン活性を 50% 阻害する力値とした蛋白分解酵素活性疎外物質の製法を提案するものである。

【0005】

【作用】 新鮮な生乳は協同乳業 (株) 松本工場より入手した。バターミルク、ホエーカゼイン画分は常法により調製した。バターミルク画分はヘキサンで完全に脱脂した。ホエー画分は分画分子量 $3,000$ の限外濾過により脱塩したものをホエー蛋白画分とした。カゼイン画分は α -s-、 β -及び κ -カゼインに分画した。システイン・プロテアーゼ類 (微生物由来、カテプシン及びババイン (Type III)) やセリンプロテアーゼ類 (アクチナーゼ AS とトリプシン) は Sigma 社より購入した。その他試薬類はすべて特級を用いた。

【0006】

【実施例】

① 脂肪球皮膜物質から CF の調製法

A. 菅野の方法に準じて新鮮な牛乳から脂肪球皮膜 (MFGM) を得、0.5 M NaCl とツイーン 20 などの界面活性剤 0.1% を含む 0.1M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に懸濁し、ポリトロン (12,000 rpm, 10 min) を用いて均質化した後、遠心分離 (5,000 rpm, 10 min) により抽出液を得た。これを分画分子量 $30,000$ の限外濾過モジュールで分画し、濾過液 (分子量 $30,000$ 以下) をを集め、分画分子量 $6,000 \sim 10,000$ の限外濾過モジュールを用いて脱塩、濃縮した。この画分を 20 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.1) に対して平衡化し、DEAE イオン交換樹脂に負荷した。非吸着画分を分子量 $6,000 \sim 10,000$ の限外濾過により脱塩、濃縮した。

B. A. で得た MFGM を 6~8 M 尿素を含む 20 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.1) に溶解し、遠心分離 (5,000 rpm, 10 min) により不溶物を除去した。DEAE イオン交換樹脂に負荷し、非吸着画分を分画分子量 $30,000$ の限外濾過モジュールを用いて分画した。濾過液をさらに分画分子量 $6,000 \sim 10,000$ の限外濾過により脱塩、濃縮した。

【0007】 ② バターミルクから CF の調製法

C. 新鮮なバターミルクの pH を 4.5 に調整し、生じた等電点沈殿物 (カゼインや一部の MFGM 構成蛋白質) を遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) により除去した。得た上清液を分画分子量 $6,000 \sim 10,000$ の限外濾過を用いて脱塩し、20 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.1) に対して平衡化し、DEAE イオン交換樹脂に負荷した。非吸着画分を分画分子量 $30,000$ の限外濾過で分画し、濾液を分画分子量 $6,000 \sim 10,000$ の限外濾過を用いて脱塩、濃縮した。

D. C. で得た等電点分画上清液を分画分子量 $30,000$ の限外濾過で分画し、濾液を分画分子量 $6,000$

~10,000の限外濾過を用いて脱塩、濃縮した。

【0008】③バターミルクパウダーからCFの調整法
E. バターミルクを噴霧乾燥したバターミルクパウダーを0.5~0.7M NaClとツイーン20などの界面活性剤0.1%を含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH 4.5)に懸濁し、常温で30分間攪拌した。遠心分離(3,000 rpm, 10 min)により抽出液を得た。これをC. 及びD. に記した方法で分画した。

【0009】④ホエー蛋白質画分からCFの調整法

表1-A. 牛乳中のシステイン・プロテアーゼ・インヒビター活性の分布

画分	システイン・プロテアーゼ・インヒビター活性(%)
全乳	100
α s-カゼイン	0
β -カゼイン	0
κ -カゼイン	0
バターミルク	70
ホエー蛋白質	30

表1-B. 各バターミルク画分のシステイン・プロテアーゼ・インヒビター活性

画分	システイン・プロテアーゼ・インヒビター活性 (units/mg)
SU-1*	11.91
SU-2*	15.60
SU-3*	13.16
SU-4*	8.17
SU-5*	4.28
SU-6*	1.83
SU-7*	0

*: SU-1~7はバターミルクを8M尿素に溶解し、可溶画分を8M尿素を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.1)で平衡化したSephadose C 30

F. チーズ又はpH 4.5の等電点分画で得たホエー蛋白質画分を、分画分子量6,000~10,000の限外濾過を用いて脱塩、濃縮し、C. 及びD. に記載の方法で調製した。

牛乳及びMFGM中のCF活性の分布を表1-Aと1-Bに、記載した方法で得たCFの比活性と回収率を表2に示した。また本記載法にて得たCFの分子量及び他のプロテアーゼ類に対する影響の結果を表3~5に示した。

表2. 各種調製法によるシステイン・プロテアーゼ・インヒビター活性とその回収率

調製法	システイン・プロテアーゼ・インヒビター活性 比活性(units/mg)	回収率(%)*
1-A	12.24	79.74
1-B	21.69	39.05
2-C	20.18	45.10
2-D	15.60	83.34
3-Ec	18.91	42.63
3-Ed	11.17	80.57
4-Fc	8.17	40.75
4-Fd	4.28	77.02

*: 回収率はそれぞれ調製前の原料中に含まれている全システイン・プロテアーゼ・インヒビター活性を100%として算出した。

表3. 牛乳中に存在するシステイン・プロテアーゼ・インヒビターの諸性状

分子量(Kd)*	等電点(pH)*	糖含量(%)*	熱安定性
13.00	3.25	ND	96°C, 20 minに安定 96°C, 60 minで失活

* : SDSポリアクリラミドゲル電気泳動法にて求めた。

* : 等電点電気泳動法にて求めた。

表5. 各種プロテアーゼに及ぼす影響

	パパイン	カテプシン	アクチナーゼAS	トリプシン
	A	B	C	

システィン・

プロテアーゼ・ 100 94.8 150.4 115.3 10.8

インヒビター活性

(%) *

* : 各プロテアーゼに対するシスティン・プロテアーゼ

・インヒビターの活性 (%) はパパインに対するインヒ

* : フエノール硫酸法にて測定した。

表4. 牛乳中に存在するシスティン・プロテアーゼ・インヒビターの構成アミノ酸残基

ビター活性を 100 % として表示した。